

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA**

**ISADORA NICOLE LARA PICCININ**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANO E  
CITOTÓXICO DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO E  
METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Tagetes minuta* VISANDO  
SEU USO NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

**FLORIANÓPOLIS - SC  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA**

**ISADORA NICOLE LARA PICCININ**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANO E  
CITOTÓXICO DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO E  
METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Tagetes minuta* VISANDO  
SEU USO NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como exigência para obtenção do Diploma de  
Graduação em Zootecnia da Universidade Federal  
de Santa Catarina.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Shirley Kuhnen

**FLORIANÓPOLIS - SC  
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Piccinin, Isadora Nicole Lara

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DOS  
EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO E METANÓLICO DAS FOLHAS DE  
Tagetes minuta VISANDO SEU USO NO TRATAMENTO DA MASTITE  
BOVINA / Isadora Nicole Lara Piccinin ; orientadora,  
Shirley Kuhn, coorientadora, Luciana Honorato,  
coorientadora, Maria Beatriz Veleirinho, 2017.

33 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Mastite Bovina. 3. Citotoxicidade. 4.  
Antimicrobiano. 5. Tagetes minuta. I. Kuhn, Shirley. II.  
Honorato, Luciana. III. Veleirinho, Maria Beatriz IV.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Zootecnia. V. Título.


Isadora Nicole Lara Piccinin

# **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANO E CITOTÓXICO DOS EXTRATOS AQUOSO, ETANÓLICO E METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Tagetes minuta* VISANDO SEU USO NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**

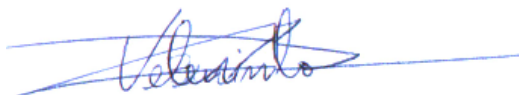
Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 21 de Novembro de 2017.

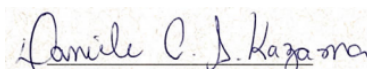
**Orientadora:**

  
Prof.<sup>a</sup> Shirley Kuhn  
DZDR/CCA/UFSC  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

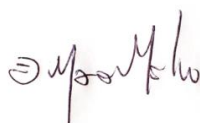
**Banca Examinadora:**



Maria Beatriz Veleirinho, Dr.<sup>a</sup>  
Coorientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.<sup>a</sup> Daniele Kazama, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina



Dario F. M. Mello, Msc.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedica a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram com a execução.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço meus pais, Georgia e Marcio, por todo o apoio durante minha jornada atrás de meus objetivos.

Obrigada aos meus irmãos, João Pedro e Rafaela, todos os momentos se tornam mais leves ao ter vocês ao meu lado.

Agradeço aos meus avós Miguel, por todo o incentivo, e Eliane por sempre repetir as palavras que tornaram-se a epígrafe deste trabalho.

Agradeço também minha orientadora Shirley Kuhnen por ter compartilhado seu conhecimento e tempo durante os mais de três anos que venho trabalhando em seu laboratório, foram tempos valiosos.

Obrigada às minhas coorientadoras, Maria Beatriz Veleirinho e Luciana Honorato, pela disposição em ensinar e me ajudar a concluir este trabalho.

Obrigada aos componentes da banca prof<sup>a</sup> Daniele, que ajudou a despertar em mim a paixão pela Bovinocultura de Leite, e Dario, que esteve presente em momentos importantes da minha formação durante o curso, ensinando e compartilhando de sua experiência.

Obrigada à Gabriela, Karin, Samira, Roni, Larissa e todos os colegas do LABIMA, a companhia de vocês fizeram o trabalho ficar muito melhor.

Obrigada aos amigos Jessica, Tuanne, Giovanna, Vinícius e Sarah, a amizade de vocês durante estes anos foi a coisa mais valiosa que alcancei.

Obrigada aos amigos Ana Carolina, André, Luisa e Alessandra, a distância não diminui a importância que vocês exercem em minha vida.

Vá aonde seu coração mandar.  
(Susanna Tamaro, 1999)

## RESUMO

A mastite bovina é caracterizada pela inflamação da glândula mamária em decorrência, principalmente, da infecção por bactérias. Esta doença é responsável por grandes perdas econômicas na cadeia produtiva do leite em função da queda na produção e do possível descarte de animais com a doença em estado avançado. Adicionalmente, o desconhecimento por parte do produtor quanto ao período de carência dos antibióticos utilizados no seu tratamento, resulta na presença de resíduos no leite comercializado, sendo um fator de risco à segurança alimentar. Diante disso, a busca por métodos alternativos para o tratamento da mastite vem se intensificando. As plantas medicinais são fontes de uma grande variedade de compostos químicos que podem agir de forma positiva na saúde dos animais. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano e citotóxico de extratos hidroalcoólicos (metanol e etanol) e aquoso de folhas de *Tagetes minuta*. Os extratos foram caracterizados quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais. A avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos foi realizada contra a cepa padrão (ATCC 25923) e isolados de *Staphylococcus aureus* através do método de microdiluição em caldo e a avaliação da citotoxicidade sobre as células epiteliais mamárias bovinas da linhagem MAC-T. Os conteúdos de flavonoides não diferiram entre as amostras e o conteúdo de fenólicos foi superior nos extratos hidroalcoólicos. A atividade antimicrobiana dos extratos em estudo foi similar, tendo sido encontrada uma concentração inibitória mínima de 250 µg/mL. Em relação a citotoxicidade, foram encontrados os valores de IC<sub>50</sub> de 434,3, 1.105 e 1.777 µg/mL para os extratos metanólico, etanólico e aquoso, respectivamente. Tais resultados evidenciam a baixa citotoxicidade dos extratos aquoso e etanólico. Portanto, em conjunto os resultados demonstraram o potencial dos extratos, principalmente do etanólico e aquoso no tratamento da mastite bovina, considerando a elevada atividade antimicrobiana frente a cepas de *S. aureus* e baixa citotoxicidade em células de linhagem MAC-T.

**Palavras-chave:** Mastite. *Tagetes minuta*. *Staphylococcus aureus*. Células MAC-T.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Efeito dos extratos de <i>Tagetes minuta</i> sobre o crescimento de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , após a adição do corante revelador resazurina (100 µg/mL).....	26
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1:** Conteúdo de fenólicos totais (mg/g) nas folhas de *Tagetes minuta* utilizando três diferentes métodos de extração.....23

**TABELA 2:** Conteúdo de flavonoides totais (mg/g) nas folhas de *Tagetes minuta* utilizando três diferentes métodos de extração.....23

**TABELA 3:** Percentual de inibição de crescimento da cepa padrão ATCC (25923) de *S. aureus* e de dois isolados de leite mastítico após exposição a diferentes concentrações dos extratos das folhas de *Tagetes minuta*.....25

**TABELA 4:** Percentual de viabilidade da linhagem celular MAC-T frente às diferentes concentrações dos extratos das folhas de *Tagetes minuta*.....27

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

µg: Micrograma

µl: Microlitro

ATCC: American Type Culture Collection

CBT: Contagem Bacteriana Total

CCS: Contagem de Células Somáticas

CIM: Concentração Inibitória Mínima

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

g: Grama

IC50: Concentração Inibitória de 50%

IN: Instrução Normativa

mg: Miligrama

MH: Mueller Hinton

ml: Mililitro

MTT: Brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio

nm: Nanômetro

PBS: Phosphate-buffered saline

SFB: Soro Fetal Bovino

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UPL: Unidade Produtora de Leite

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
3.1 BOVINOCULTURA DE LEITE.....	17
3.2 MASTITE.....	17
3.3 TRATAMENTO.....	18
3.4 <i>Tagetes minuta</i> .....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1 COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	21
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	21
4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE.....	22
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
5.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA.....	24
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	25
5.3 AVALIAÇÃO DA CITOXIDADE.....	27
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo (FAO, 2013). A atividade que está se desenvolvendo dentro do país, teve em 2015, uma queda de 2,9% em relação ao ano anterior, ou seja, 33,6 bilhões de litros de leite (MILKPOINT, 2017). Em âmbito nacional, a região Sul é a segunda maior região em volume de leite produzido, perdendo apenas para o Sudeste. O estado de Santa Catarina é o quarto maior estado produtor de leite do País, sendo a agricultura familiar responsável por 90% da produção (GOVERNO DE SC, 2016).

Apesar do desenvolvimento crescente da atividade, é considerável o número de produtores que não consegue se enquadrar nos padrões de qualidade do leite estabelecidos pela legislação brasileira. Esta já sofreu diversas mudanças quanto aos prazos de adequação do leite aos números de Contagem de Células Somáticas (CCS) e de Contagem Bacteriana Total (CBT) (BRASIL, 2011). Os valores máximos para CCS e CBT no leite estão regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da IN 62 (BRASIL, 2011) e justificam-se por indicarem a inflamação e/ou infecção da glândula mamária e a contaminação do leite após a ordenha, respectivamente.

A mastite bovina é uma doença plurietiológica, sendo caracterizada pela inflamação da glândula mamária em decorrência, principalmente, da contaminação por bactérias, sendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* as mais frequentes (BRADLEY, 2002).

Esta doença é responsável por grandes perdas econômicas em rebanhos leiteiros em função da queda na produção e qualidade do leite, possível descarte de animais com a doença em estado avançado (mastite clínica) e interferência no bem-estar dos animais. Adicionalmente, o desconhecimento dos produtores quanto ao período de carência dos antibióticos utilizados no tratamento da doença, pode resultar na presença de resíduos no leite comercializado, sendo um fator de risco à segurança alimentar. Em amostras de leite comercializadas no Paraná, por exemplo, 19% estavam contaminadas com resíduos dos antibióticos cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, estreptomicina e  $\beta$ -lactâmicos (VIEIRA et al., 2012).

Diante do exposto, a demanda por métodos alternativos e sustentáveis para o tratamento da mastite tem se tornado cada vez maior, abrindo espaço para a busca de novos produtos com potencial antimicrobiano encontrados, por exemplo, nas plantas medicinais. Diversos estudos têm demonstrado este potencial. Avancini et al. (2008), avaliaram 21 plantas nativas do sul do Brasil quanto a sua atividade antimicrobiana, sendo que 57% delas apresentaram alguma atividade frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella cholerae suis*.

A *Tagetes minuta*, popularmente conhecida como “cravo de defunto”, “chinchilho”, “cravo de urubu” ou “coari”, é uma planta arbustiva encontrada no Sul do Brasil, sendo conhecida por seus efeitos antifúngicos (TERESCHUKA et al., 1997) e antimicrobianos (SOUZA et al., 2000). Os estudos com esta espécie foram majoritariamente realizados com o óleo extraído de suas folhas (SCRIVANT et al., 2006; CHAMORRO et al., 2008), e pouco se conhece sobre o efeito antimicrobiano de extratos hidroalcoólicos e aquoso preparados a partir das folhas desta planta. SOUZA et al. (2000), testaram o decocto frente a cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas, encontrando potencial como desinfetante para a indústria e produção animal.

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de extratos hidroalcoólicos (metanol e etanol) e aquoso das folhas de *Tagetes minuta* frente à cepas de *Staphylococcus aureus* e seu efeito citotóxico em células de glândula mamária bovina da linhagem MAC-T, visando seu uso no tratamento da mastite bovina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano e citotóxico dos extratos aquoso, etanólico e metanólico das folhas de *Tagetes minuta* no tratamento da mastite bovina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterização fitoquímica dos extratos metanólico, etanólico e decocto das folhas de *T. minuta*, através da determinação dos teores de fenólicos e flavonóides totais.
2. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos extratos metanólico, etanólico e decocto das folhas de *T. minuta* frente a cepa padrão de *S. aureus* (ATCC25923) e isolados de leite mastítico.
3. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos extratos metanólico, etanólico e decocto das folhas de *T. minuta* em células de linhagem MAC-T.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 BOVINOCULTURA DE LEITE

O Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo (FAO, 2013). Entretanto, de acordo com dados do IBGE (2013), a produtividade brasileira é de 1.135 kg/vaca/ano, estando consideravelmente abaixo da média mundial de 2.109 kg/vaca/ano (FAO, 2015). Santa Catarina ocupa o quarto lugar no ranking nacional de produção, estando boa parte concentrada na região Oeste do estado.

Ao mesmo tempo em que a produção leiteira é fundamental para a permanência no campo das famílias desta região e para o desenvolvimento territorial, o número de Unidades Produtoras de Leite que não consegue se enquadrar nos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação é preocupante (BRASIL, 2011). As principais causas para o insucesso estão relacionadas a higiene na hora da ordenha e saúde dos animais, sendo utilizados como parâmetros os valores máximos de Contagem Bacteriana Total (CBT) e de Contagem de Células Somáticas (CCS), respectivamente (HONORATO et al., 2014; DARÓS et al., 2012; KUHNNEN et al., 2015).

Estes valores máximos estão regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento através da IN 62 (BRASIL, 2011) e justificam-se por indicarem a inflamação e/ou infecção (mastite) da glândula mamária e a contaminação do leite após a ordenha, respectivamente.

#### 3.2 MASTITE

A mastite é uma doença resultante da interação de fatores relacionados ao animal, ao patógeno e ao ambiente (BRITO&BRITO, 2000). É caracterizada pela inflamação da glândula mamária em decorrência, principalmente, da contaminação por bactérias, sendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* os microorganismos mais frequentes (BRADLEY, 2002).

Dependendo da forma como se manifesta, ela pode ser classificada como Clínica ou Subclínica, com sinais evidentes (rubor, enrijecimento dos tetos, pus e alterações no leite) e não evidentes (alterações na composição do leite),



respectivamente. Segundo PHILPOT & NICKERSON (1991) para cada caso clínico de mastite existem entre 15 a 40 casos subclínicos.

A mastite também pode ser classificada quanto ao seu modo de transmissão e origem. A mastite contagiosa está relacionada com a transmissão de patógenos de um animal infectado para outro, ou seja, sua incidência dentro do rebanho é definida pelo nível de higiene de ordenhadeiras e outros utensílios de um animal para outro e pela higienização dos tetos antes da ordenha. Enquanto a mastite ambiental tem relação com a sanidade do ambiente, como o acúmulo de fezes e matéria orgânica nos locais de descanso (COSER et al., 2012).

Esta enfermidade é um dos principais entraves da produção leiteira por significar inúmeras perdas econômicas nos rebanhos, interferindo na produtividade e qualidade do leite, no bem-estar dos animais, e afetando a elaboração de produtos lácteos.

As formas mais comuns de erradicação da mastite de rebanhos, segundo BRITO & BRITO (2000), seriam através do descarte seletivo de animais frequentemente acometidos, o tratamento adequado e o esgotamento apropriado dos tetos após a ordenha.

### 3.3 CONTROLE E PROFILAXIA

A prevenção da mastite consiste na adoção de práticas que limitem a presença de agentes causadores desta enfermidade nos rebanhos, buscando diminuir sua incidência e, conseqüentemente, seu impacto econômico na atividade leiteira. Este objetivo pode ser alcançado desde a seleção dos animais naturalmente resistentes para reprodução, até práticas diárias, como a higiene dos tetos e ordenhadeira (TOZZETI et al., 2008 ).

Segundo Coelho et al. (2002), a terapia da vaca seca pode ser uma medida de prevenção de uma nova infecção através da administração do medicamento de forma intramamária em todos os quartos.

Além do exposto, a vacinação também é uma opção viável para produtores com grandes incidências desta enfermidade no rebanho. Silva (2003), por exemplo, encontrou resultados promissores no controle da mastite causada por *S. aureus*.

O monitoramento desta enfermidade no rebanho é uma prática fundamental para manter o controle da doença (MUELLER, 2002), isso pode ocorrer através de testes como o da caneca de fundo preto (mastite clínica) e CMT (mastite subclínica).

A identificação precoce desta enfermidade no rebanho, permite a indicação de uma estratégia de tratamento adequada, elevando a possibilidade de erradicação da doença.

### 3.4 TRATAMENTO

O tratamento da mastite bovina é realizado, principalmente, com antibióticos, sendo que muitas vezes, este medicamento é utilizado erroneamente como agente de prevenção desta enfermidade, sendo uma das principais causas da ocorrência de resistência bacteriana. A estratégia de tratamento pode depender da manifestação da mastite, podendo apresentar-se de forma hiperaguda, aguda, subaguda ou subclínica (TOZZETI et al., 2008)

Diversos trabalhos investigam o perfil de resistência de bactérias como *S. aureus*, causadora da mastite bovina, verificando que diversos antibióticos não apresentam 100% de eficácia (ANDRADE, et al., 2000) e outros demonstram uma resistência elevada (ZAFALON et al., 2008), sendo a penicilina o antibiótico de menor efeito contra esta bactéria em ambos os estudos.

Além disso, a quantificação da eficácia de agentes antimicrobianos no tratamento da mastite é um fator difícil de ser mensurado em função do grande número de microrganismos que podem causar esta enfermidade e do grau de infecção desenvolvido (TOZZETI et al., 2008).

Diante do exposto, alternativas de tratamento são cada vez mais necessárias, principalmente em sistemas de produção agroecológicos, que possuem restrições quanto ao uso de antibióticos. As plantas medicinais apresentam um grande potencial frente a agentes patogênicos. Palombo & Semple (2001), avaliaram o potencial antimicrobiano de plantas tradicionais da Austrália frente a diferentes cepas, entre elas o *S. aureus*, encontrando um total de 12 plantas que inibiram a ação de uma ou mais delas.

Já Avancini et al. (2008), avaliaram 21 plantas nativas do sul do Brasil quanto a sua atividade antimicrobiana, sendo que 57% delas apresentaram alguma atividade frente a cepas de *S. aureus* e *Salmonella cholerae suis*.

Tais estudos evidenciam o potencial de plantas como possíveis alternativas no tratamento da mastite, destacando o potencial de se encontrar novos agentes terapêuticos entre elas.

### 3.5 *Tagetes minuta*

O *Tagetes minuta*, popularmente conhecido como “cravo de defunto”, “chinchilho”, “cravo de urubu” ou “coari”, é uma planta arbustiva encontrada no Sul do Brasil, sendo conhecida por seus efeitos antifúngico (TERESCHUKA et al., 1997) e antimicrobiano (SOUZA et al., 2000). A composição (THAPPA et al., 2011; CHAMORRO et al., 2008) e efeito antimicrobiano (SENATORE et al., 2004) do seu óleo tem sido bastante estudados, bem como as propriedades medicinais (LORENZI, 2008), inseticidas (IRERI et al., 2010; CESTARI et al., 2004) e larvicida (LIMA et al., 2009) do óleo e dos extratos.

SOUZA et al. (2000), avaliaram o efeito antimicrobiano dos extratos das folhas de *Tagetes minuta* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, observando um maior efeito sobre as Gram-positivas e um efeito quase nulo frente a *Escherichia coli*. Enquanto isso, TERESCHUKA et al. (1997), avaliando a ação dos flavonoides das folhas de *Tagetes minuta*, observaram atividade contra *E. coli* na concentração de 500 µg/ml.

Neste sentido, considerando o potencial antimicrobiano desta planta e sua possível utilização no tratamento da mastite bovina, o presente trabalho teve como objetivo avaliar in vitro os seus efeitos sobre o crescimento de *S. aureus* e viabilidade sobre as células MAC-T, visando o uso intramamário.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

A coleta da parte aérea das plantas foi realizada na Fazenda Experimental da UFSC em Maio de 2017, tendo sido monitoradas desde a sua floração e, antes de senescer, foram coletadas. O material foi seco em estufa de circulação forçada à 40°C por 48 horas e armazenados à -80°C.

A extração dos compostos de interesse foi realizada a partir da maceração do material vegetal (0,1g), separando-se as folhas das inflorescências. Os compostos de interesse foram extraídos a partir das folhas e inflorescências utilizando-se a maceração com metanol 80% ou etanol 80%. Além da maceração, a decocção foi também utilizada para preparação do extrato aquoso. Para obtenção dos extratos hidroalcóolicos, o material vegetal (0,1g) foi macerado com os solventes metanol 80% ou etanol 80% (15 mL). Já a decocção consistiu na adição de H<sub>2</sub>O (15 mL) ao material vegetal (0,1g), que foi mantido em banho-maria à 100°C por 15 minutos. Todos os extratos foram filtrados a vácuo, secos em centrífuga *speed vac* e armazenados a -20°C. As extrações foram realizadas em triplicata. Posteriormente, os extratos foram ressuspensos em água para determinação dos teores de fenólicos e flavonoides totais, utilizando-se os métodos de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965) e cloreto de alumínio (POPOVA et al., 2004), respectivamente.

### 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os extratos das folhas de *Tagetes minuta* foram testados frente a cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e dois isolados de leite mastítico do oeste de Santa Catarina. A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo Mueller-Hinton (MH), de acordo com a Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (NCCLS, 2003), com modificações. Brevemente, foram acrescidos 100 µl das diluições seriadas (15,62 a 2000 µg/mL) dos 3 extratos de *Tagetes minuta* à 100 µL de caldo MH e 10 µL da suspensão bacteriana. A suspensão bacteriana foi padronizada para 0,5 da escala McFarland (equivalente a 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/mL), onde, após diluições seriadas, continha 5x10<sup>5</sup> UFC/mL. Além das diferentes concentrações dos extratos, o ensaio

incluiu dois controles, sendo um deles o controle positivo (caldo MH acrescido do inóculo) e um negativo, contendo as diferentes concentrações dos extratos em caldo MH, sem o inóculo. As microplacas foram incubadas à 37°C por 24 horas.

Após a incubação, o valor das absorbâncias dos poços das microplacas foi determinado à 625 nm, para cálculo da porcentagem de inibição do crescimento bacteriano. Para isso, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$(1 - ((\text{absorbância do tratamento} - \text{absorbância do controle negativo}) / \text{absorbância do controle positivo})) * 100$$

Após a leitura das microplacas, 50 µL do revelador resazurina (100 µg/mL) foi adicionado a cada um dos poços para a confirmação visual da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual é determinada pela ausência de turbidez nos poços. Após a adição do revelador, as microplacas foram novamente incubadas à 37°C por 30 minutos. Com o uso do corante, a presença de cor azul representa a ausência de crescimento bacteriano e a cor rosa a presença de crescimento. O resultado das leituras no espectrofotômetro e da resazurina foram comparados.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE

A avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais foi realizada sobre células epiteliais da glândula mamária bovina de linhagem MAC-T. As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) e suplementadas com 20% de soro fetal bovino (SFB), 4 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glucose, 1 mM piruvato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 5 µg/mL de insulina e 1 µg/mL de hidrocortisona. O meio foi trocado a cada 48 h e as células mantidas em cultura à 37°C, e atmosfera modificada a 5% de CO<sub>2</sub>. Quando as células atingiam confluência, foram tratadas com 0,25% de tripsina, lavadas com PBS e contadas em câmara de Neubauer. A citotoxicidade dos extratos sobre as MAC-T foi realizada pelo método do brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio (MTT), com modificações. Para isso, ao meio de cultura contendo as células aderentes, foram acrescidas diferentes concentrações dos extratos vegetais (15,62 a 2000 µg/mL). Após 24 h de incubação à 37°C em atmosfera modificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, os poços foram lavados duas vezes com PBS (100 µL/poço) e o MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado e incubado por mais 2 horas. Neste ensaio, quantificou-se quanto do

MTT presente no meio foi metabolizado, pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP, formando cristais de formazan (cristais de cor azul) (Reuter, 2008). Assim, a quantidade de formazan foi medida por espectrofotometria em leitor de microplacas à 546 nm (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc) e considerada diretamente proporcional ao número de células viáveis. O controle (i.e. meio fresco sem o extrato) foi considerado como 100% de células viáveis. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O conteúdo de flavonóides e fenólicos totais, potencial antimicrobiano e citotoxicidade dos extratos metanólico, etanólico e decocto de *T. minuta* foram submetidos a análise de variância multifatorial com separação de médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Também foi determinada a IC<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50% das células) através de análise de regressão não-linear. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graph Pad Prism 5.0<sup>®</sup>.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA

Os conteúdos de fenólicos e flavonoides totais encontrados nas amostras em estudo estão mostrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os conteúdos de flavonoides não diferiram entre as amostras, considerando o método de extração ou a parte da planta utilizada para a extração. Quanto ao teor de fenólicos totais, foi encontrado maior conteúdo nas folhas comparado às inflorescência, que apresentou conteúdos muito inferiores e, por este motivo, não foi utilizada (dados não mostrados). Além disso, a extração hidroalcoólica mostrou-se mais eficiente que a decocção para extração de fenólicos. TERESCHUKA, et al. (1997) associaram a presença destes componentes ao efeito antimicrobiano das folhas de *T. minuta*.

**TABELA 1:** Conteúdo\* de fenólicos totais (mg/g) nas folhas de *Tagetes minuta* utilizando três diferentes métodos de extração.

	Maceração com metanol	Maceração com etanol	Decocção
<b>Folhas</b>	0,511±0,0049 <sup>Aa</sup>	0,375±0,0014 <sup>Aa</sup>	0,186±0,001 <sup>Ba</sup>

\*(média±desvio padrão). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas considerando os métodos de extração testados. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas considerando as diferentes partes da planta utilizada.

**TABELA 2:** Conteúdo\* de flavonoides totais (mg/g) nas folhas de *Tagetes minuta* utilizando três diferentes métodos de extração.

	Maceração com metanol	Maceração com etanol	Decocção
<b>Folhas</b>	0,056±0,0007 <sup>Aa</sup>	0,051±0 <sup>Aa</sup>	0,04±0,0001 <sup>Aa</sup>

\*(média±desvio padrão). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas considerando os métodos de extração testados. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas considerando as diferentes partes da planta utilizada.

A escolha do método de extração a ser utilizado, considerando o tipo de solvente, são fatores determinantes para obtenção de um extrato contendo alto teor dos compostos de interesse. É sabido, por exemplo, que o uso de solventes

orgânicos, como etanol e metanol, ou soluções hidroalcoólicas, podem otimizar o processo de extração de tais compostos (OLIVEIRA, 2005).

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A Tabela 3 mostra os resultados encontrados nos ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *T. minuta*. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os 3 extratos em estudo. A porcentagem de redução do crescimento bacteriano foi superior a 90% para todos os extratos na concentração de 500 µg/mL. No entanto, com a utilização do revelador resazurina verificou-se que a concentração inibitória mínima (CIM), para todos os extratos em estudo, foi 250 µg/mL (Figura 1). Nesta concentração, a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi próxima de 80% (Tabela 3). O uso do revelador resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, incluindo células bacterianas (O'BRIEN et al., 2000). Neste ensaio, a cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e a cor rosa, presença de crescimento (PALOMINO et al., 2002). Desse modo, torna-se bastante fácil a visualização da CIM do agente antimicrobiano em estudo.

**TABELA 3:** Percentual\* de inibição de crescimento da cepa padrão ATCC (25923) de *S. aureus* e de dois isolados de leite mastítico após exposição a diferentes concentrações dos extratos das folhas de *Tagetes minuta*.

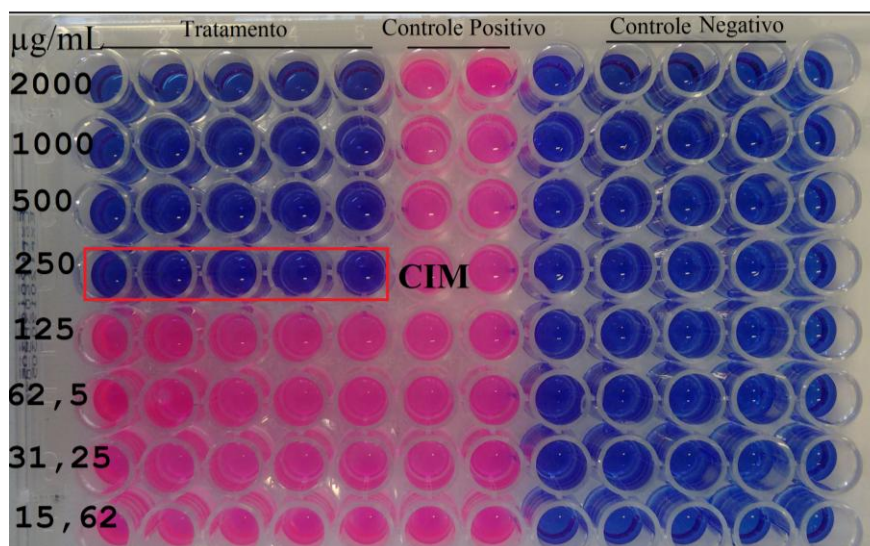
Concentração (µg/mL)	% de Inibição do Crescimento Bacteriano		
	Maceração com Etanol	Maceração com Metanol	Decocção
<b>2000</b>	95±16,38 <sup>Aa</sup>	93±24,5 <sup>Aa</sup>	94±20,5 <sup>Aa</sup>
<b>1000</b>	93,25±27,56 <sup>Aa</sup>	93±28,3 <sup>Aa</sup>	92±29,04 <sup>Aa</sup>
<b>500</b>	94±25,7 <sup>Aa</sup>	93±30,8 <sup>Aa</sup>	92±29,4 <sup>Aa</sup>
<b>250</b>	89±27,6 <sup>Aab</sup>	90±31,9 <sup>Aa</sup>	76±40,7 <sup>Aab</sup>
<b>125</b>	50±28,8 <sup>Abc</sup>	66±40,3 <sup>Aab</sup>	36±35,2 <sup>Abc</sup>
<b>62,5</b>	31±9,4 <sup>Ac</sup>	30±12,8 <sup>Ab</sup>	26±5,6 <sup>Ac</sup>



<b>31,25</b>	29±9,6 <sup>Ac</sup>	22±10,08 <sup>Ab</sup>	28±5,7 <sup>Ac</sup>
<b>15,62</b>	30±12,2 <sup>Ac</sup>	28±13,13 <sup>Ab</sup>	25±11,9 <sup>Ac</sup>

\*(média±desvio padrão). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os extratos e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre as concentrações.

SOUZA et al. (2000), ao estudarem o efeito do decocto de *T. minuta* frente a cepas de bactérias GRAM positivas e GRAM negativas, observaram que, *Staphylococcus aureus* está entre as mais sensíveis a este extrato corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Por outro lado, TERESCHUKA et al. (1997), avaliando a ação de flavonoides das folhas de *T. minuta*, observaram atividade contra *E. coli* nas concentrações de 500µg/mL.



**Figura 1:** Efeito dos extratos de *Tagetes minuta* sobre o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus*, após a adição do corante revelador resazurina (100 µg/mL).

É importante destacar que a maior parte da literatura sobre o efeito antimicrobiano desta planta, foi realizada com o seu óleo essencial, sendo escassas informações sobre os efeitos dos extratos hidroalcoólicos ou mesmo aquoso. Entretanto, o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *T. minuta* não parece tão promissor quanto o dos extratos hidroalcoólicos ou aquoso. Sperândio et al. (2016), por exemplo, ao avaliarem o óleo de *Tagetes minuta* frente a cepas de *S. aureus*, utilizando a metodologia descrita no presente trabalho, encontrou uma CIM de 1000 µg/mL.

Ainda é importante destacar que a composição dos extratos pode variar de acordo com o estágio fenológico da planta, modo de cultivo, época de coleta e fatores ambientais (EMBRAPA, 2017).

### 5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE

Considerando o potencial antimicrobiano dos extratos em estudo e que o seu uso poderá ser intramamário, procedeu-se com a avaliação da sua citotoxicidade sobre as células epiteliais mamárias bovinas da linhagem MAC-T. A percentagem de células da linhagem MAC-T viáveis após a exposição as diferentes concentrações dos extratos em estudo está mostrada na Tabela 4.

**TABELA 4:** Percentual\* de viabilidade da linhagem celular MAC-T frente às diferentes concentrações dos extratos das folhas de *Tagetes minuta*.

CONCENTRAÇÃO	VIABILIDADE CELULAR (%)		
µg/mL	Maceração com Metanol	Maceração com Etanol	Decocção
2000	19,7±5,7 <sup>Aa</sup>	20,74±1,4 <sup>Aa</sup>	38,66±6,3 <sup>Aa</sup>
1000	34,9±7,7 <sup>Aa</sup>	40,86±2,7 <sup>Ab</sup>	65,99±4,9 <sup>Aa</sup>
500	56,65±7,4 <sup>Aa</sup>	82,98±7,2 <sup>Ac</sup>	86,16±8,1 <sup>Aa</sup>
250	64,65±5,9 <sup>Aa</sup>	96,80±11,7 <sup>Ac</sup>	87,53±15,3 <sup>Aa</sup>
125	73±16,4 <sup>Ab</sup>	97,49±15,7 <sup>Ac</sup>	97,26±23,1 <sup>Ab</sup>
62,5	71,75±6 <sup>Aa</sup>	97,38±22,9 <sup>Ac</sup>	102±32,8 <sup>Ab</sup>
31,25	72,8±4,3 <sup>Ac</sup>	97,08±18,5 <sup>Ac</sup>	91,59±33,4 <sup>Ab</sup>
15,62	91,45±15,9 <sup>Ac</sup>	101,11±18,3 <sup>Ac</sup>	87,09±26,5 <sup>Ab</sup>
0	100±14,4 <sup>Ac</sup>	100±4 <sup>Ac</sup>	100±8,2 <sup>Ab</sup>

\* Média ± desvio padrão. As letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre os métodos de extração e as letras minúsculas diferentes representam diferenças entre as concentrações.

Dos extratos hidroalcoólicos, o etanol apresentou menor citotoxicidade em comparação ao metanol, com efeito significativo sobre a viabilidade das células MAC-T a partir de 1000 µg/mL (cerca de 40% de células viáveis). De maneira similar, o decocto também reduziu a viabilidade das células para cerca de 65% em uma concentração de 1000 µg/mL. Já para o extrato que utilizou metanol como solvente, este efeito já foi observado a partir de 500 µg/mL (cerca de 50% de células viáveis).

Os valores de IC50 para os extratos metanolico, etanolico e aquoso foram 434,3, 1105 e 1777 µg/mL, respectivamente. Tais resultados quando relacionados com os da atividade antimicrobiana são bastante promissores, uma vez que a concentração inibitória mínima frente as cepas de *S. aureus* foi 250 µg/mL para todos os extratos em estudo, sendo esta bem inferior àquelas que possuem efeito sobre a viabilidade das células. Nesta concentração, a viabilidade celular é próxima de 90% para o extrato preparado com etanol e por decocção (Tabela 4). Tais resultados, em função de seu alto efeito antimicrobiano e baixa citotoxicidade, demonstram o potencial destes extratos no tratamento intramamário da mastite.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou o potencial dos extratos etanólico e aquoso de *Tagetes minuta* no tratamento da mastite bovina, demonstrando seu elevado efeito antimicrobiano frente a cepas de *S. aureus* e baixo efeito citotóxico frente a células MAC-T, especialmente do extrato aquoso.

Recomenda-se a realização de outros estudos destes extratos visando a preservação dos compostos ao longo do tempo, como ensaios de permeação cutânea, potencial como desinfetante e associação a outras tecnologias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M.A. et al. 2000. Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*, v. 1, n. 1.
- AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. 2008. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 10, p. 21-28.
- AVANCINI, C., WIEST, J.M., DALL'AGNOL, R., SCHULTE, J. 2008. Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*. 894-9.
- BRADLEY, A. J. 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, v. 164, p. 116-128.
- BRASIL. 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 524, de junho de 2011. Normativa nº51 de 19 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Brasil.
- BRASIL. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 524, de junho de 2011. Normativa nº62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, Brasil.
- BRITO, J.R.F; BRITO, M. A.V.P. 2000. Mastite bovina, São Paulo: Manole, pag 114-129.
- CESTARI, I. M. et al. 2004. Evaluation of the potential insecticide activity of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil against the head lice *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Neotropical Entomology*, v. 33, n. 6, nov.
- CHAMORRO, E. R. et al. 2008. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *Journal of the Argentine Chemical Society*, v. 96, n. 1-2, p. 80-86.
- COELHO, V. et al. 2002. O. A avaliação da influência da intensidade de mastite em quarto tratado por via intramamária na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite de quartos mamários não tratados. *Revista Napgama*. São Paulo, v. 5, n. 1.
- COSER, S. M. et al. 2012. Mastite bovina: controle e prevenção. In: *Boletim Técnico* - n. 93, p. 1-30, 2012. Universidade Federal de Lavras, LavrasMG.
- DAROS, R.R.; COSTA, J. H. C.; BERTOLI, F.; LONGO, C.; HÖTZEL, M. J. 2012. Qualidade do leite e a IN 62 no noroeste de Santa Catarina. In: *Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 2012, 4pp.

EMBRAPA. 2012. Sistemas de produção de leite para diferentes regiões do Brasil. Disponível em: [http://www.cnp.gl.embrapa.br/sistema\\_producao/](http://www.cnp.gl.embrapa.br/sistema_producao/). Acesso em 09/08/2013.

EMBRAPA. 2017. Cultivo de plantas aromáticas. 1ª edição. 49 p.

FAO, FAOSTAT – Statistics Database. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>. Acesso em: Agosto de 2017.

GOVERNO DE SC. 2016. Região sul do Brasil lidera produção nacional de leite. Disponível em: <http://www.sc.gov.br/index.php/noticias/temas/agricultura-e-pesca/regiao-sul-do-brasil-lidera-producao-nacional-de-leite>

GURIB-FAKIM, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27: 1–93.

HONORATO, L.A.; MACHADO FILHO, L.C.; BARBOSA SILVEIRA I.D.; HOTZEL, M.J. 2014. Strategies used by dairy family farmers in the south of Brazil to comply with organic regulations. *Journal of Dairy Science*, 97: 3, 1319-27.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário. Disponível em: [http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro\\_2006.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf). Acesso em: 13 mar. 2017.

IRERI, L. N. et al. 2010. The potential of the extracts of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae), *Acalypha fruticosa* Forssk (Euphorbiaceae) and *Tarhonanthus camphoratus* L. (Compositae) against *Phlebotomus duboscqi* Neveu Lemaire (Diptera: Psychodidae), the vector for *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor. *Journal of Vector Borne Diseases*, v. 47, n. 3, p. 168-174.

KUHNEN, S.; STIBUSKI, R.B.; HONORATO, L.A.; MACHADO FILHO, L.C. 2015. Farm Management in Organic and Conventional Dairy Production Systems Based on Pasture in Southern Brazil and Its Consequences on Production and Milk Quality. *Animals*, 5: 3, 479-494.

ETKIN, N.L. 1993. Antropological methods in ethnopharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 38. P. 93-104.

LIMA, W. P. et al. 2009. Estabelecimento de metodologia para alimentação de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae) em camundongos swiss e avaliação da toxicidade e do efeito residual do óleo essencial de *Tagetes minuta* L (Asteraceae) em populações de *Aedes aegypti*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 6, p. 638-641.

LORENZI, H. 2008. Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas. Nova Odessa, SP. 2ª Ed.

MÜLLER, E.E. et al. 2002 Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. *Anais do II Sul Leite*.

NCCLS. 2013. Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana. M100-S15. Vol 25, n 1.

O'BRIEN, J. et al. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *US National Library of Medicine National Institute of health*. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x

OLIVEIRA, V.B. et al. 2005. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clausenol de *Dicksonia sellowiana* (Presl.). Hook, dicksoniaceae. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.230-239, 2016

PALOMBO, E.A., SEMPLE, S.J. 2001. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. US National Library of Medicine National Institute of Health. DOI: 10.1016/S0378-8741(01)00290-2

PALOMINO, J.C. et al. 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. US National Library of Medicine National Institute of Health. DOI: 10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. 1991. Mastitis: Counter Attack. Naperville: Babson Bros, Pag 150.

POPOVA, M. et al. 2004. Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-Type Propolis. Phytochem Anal 15 (4), 235-240.

SCRIVANTI, L.R.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A. 2013. *Tagetes minuta* and *Schinus molle* essential oils as allelopathic agents. Biochemical Systematics and Ecology, v.31, p.563-72.

SENATORE, F. et al. 2013. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. Flavour and Fragrance Journal, v. 19, n. 6, p. 574–578.

SINGLETON, V.A, ROSSI, J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American journal of enology and viticulture, pag 144-158.

SOUZA, C.A.S; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. 2000. Atividade Antimicrobiana de *Tagetes minuta* L – *Compositae* (chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. São Paulo, v. 37, n. 6, p. 429-433.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C., BRITO, M.A.V.P.; SILVA, M.V.G.B. 2009. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n. 5, p. 1015-1020.

SPERÂNDIO, J. et al. 2016. Avaliação *in vitro* do óleo essencial de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) no tratamento da mastite bovina. Repositório UFSC. 55 p.

TERESCHUKA, M.L. et al. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. Journal of Ethnopharmacology 56 (1997) 227–232.

THAPPA, R. K; et al. 1992. Changes in Chemical Composition of *Tagetes minuta* Oil at Various Stages of Flowering and Fruiting. Journal of Essential Oil Research, 5. ed., v. 5, p. 375-379.

TOZZETTI, D.S. et al. 2008. Prevenção, controle e tratamento da mastite bovina – Revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano 5, n 10.

VIEIRA, T.S.W.J.; RIBEIRO, M.R.; NUNES, M.P.; MACHINSKI JÚNIOR, M.; PONTES NETTO, D. 2012. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite pasteurizado do Estado do Paraná, Brasil. Semina: Ciências Agrárias. v. 33, n. 2, p. 791- 796.

WIEST, J. M. et al. 2009. Inibição e inativação in vitro de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n. 1, p. 119- 127.

ZAFALON, L.F. et al. 2008. Investigação de perfis de resistência ao antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. Revista do Instituto Adolfo Lutz. v. 67, n2.